FACULTÉ DE MÉDECINE DE STRASBOURG

ANNÉE 1931 N° 21

Thèse présentée pour le Doctorat en médecine

par

STAHL Jules

né à Barr (Bas-Rhin), le 6 octobre 1902

Ancien Interne des Hôpitaux de Strasbourg.

Recherches sur un principe hyperglycémiant d'origine pancréatique.

Président : M, AMBARD, Professeur

Librairie Universitaire d'Alsace
STRASBOURG
1931

FACULTÉ DE MÉDECINE DE STRASBOURG

ANNÉE 1931 N° 21

Thèse présentée pour le Doctorat en médecine

par

STAHL Jules

né à Barr (Bas-Rhin), le 6 octobre 1902

Ancien Interne des Hôpitaux de Strasbourg.

Recherches sur un principe hyperglycémiant d'origine pancréatique.

Président : M, AMBARD, Professeur

Librairie Universitaire d'Alsace
STRASBOURG
1931

FACULTE DE MEDECINE DE STRASBOURG

Doyen	MM.	MERKLEN ✲ ⁂ I.
Assesseur		NICLOUX ✲ ⁂ I.

Professeurs

Embryologie	MM.	ANCEL ✲ ⁂ I.
Anatomie		FORSTER ✲ ⁂ I.
Histologie		BOUIN O. ✲ ⁂ I.
Physiologie		SCHAEFFER ⁂ I.
Physique biologique		VLES ✲ ⁂ I.
Chimie biologique		NICLOUX ✲ ⁂ I.
Anatomie pathologique		MASSON ✲ ⁂ I.
Pharmacologie, Médecine expérimentale		N.....
Hygiène, Bactériologie		BORREL C. ✲ ⁂ A.
Médecine légale		CHAVIGNY C. ✲ ⁂ I.
Clinique médicale	(	MERKLEN ✲ ⁂ I.
	(	AMBARD ✲ ⁂ I.
Clinique chirurgicale	(	LERICHE O. ✲ ⁂ I.
	(	STOLZ ✲ ⁂ I.
Clinique ophtalmologique		WEILL ⁂ I.
Clinique dermatologique		PAUTRIER O. ✲ ⁂ I.
Clinique psychiatrique		PFERSDORFF ✲ ⁂ I.
Clinique neurologique		BARRE ✲ ⁂ I.
Clinique gynécologique et accouchements		REEB ⁂ I.
Clinique infantile		ROHMER ✲ ⁂ I.
Clinique oto-rhino-laryngologique		CANUYT ⁂ A.

Professeurs sans chaire:

MM. ARON Max ⁂ I.
BELLOCQ ⁂ I.
FONTES ⁂ A.
GERY ⁂ A.
SCHWARTZ ⁂ I.

Chargés de cours et Agrégés:

MM. BENOIT
BLUM (Paul) O. ✲ ⁂ I.
GELMA ⁂ A.
GUNSETT ✲ ⁂ A.
HANNS ✲ ⁂ A.
HUMBERT ✲ ⁂ A.
KAYSER
KELLER ⁂ A.
KREISS
LARROUSSE ⁂ A.
REISS
SIMON ✲ ⁂ A.
SIMONIN ✲.
VAUCHER ⁂ A.
WEISS A.

R. UNIV. BIBLIOTHEEK LEIDEN

Chargés d'un cours complémentaire:

MM. A. BOECKEL ✲, MEYER M., ROEDERER

Serment d'Hippocrate.

En présence des maîtres de cette école, de mes chers condisciples, je promets et je jure au nom de l'Être suprême d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité dans l'exercice de la médecine. Je donnerai mes soins gratuits à l'indigent et n'exigerai jamais un salaire au-dessus de mon travail.

Admis dans l'intérieur des maisons, mes yeux ne verront pas ce qui s'y passe.

Ma langue taira les secrets qui me seront confiés et mon état ne servira pas à corrompre les moeurs ni à favoriser le crime.

Respectueux et reconnaissant envers mes maîtres, je rendrai à leurs enfants l'instruction que j'ai reçue de leurs pères.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis resté fidèle à mes promesses! Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque

A MES PARENTS

A MON FRERE

A MES AMIS.

V

A la Mémoire de mon regretté Maître

le Professeur

LÉON BLUM

Professeur de Clinique Médicale à la Faculté

Officier de la Légion d'Honneur

A mon Maître, Monsieur le Professeur

AMBARD

Professeur de Clinique Médicale à la Faculté

qui a bien voulu accepter la Présidence de cette thèse, témoignage de mon respectueux dévouement.

A Monsieur le Professeur

Georges SCHAEFFER

Professeur de Physiologie à la Faculté

qui m'a toujours réservé un accueil bienveillant, et dont les conseils précieux, ont facilité dans une large mesure mes recherches.

A Monsieur le Professeur

Maurice NICLOUX

Professeur de Chimie Biologique à la Faculté

qui m'a reçu dans son laboratoire, et m'a initié aux techniques de Chimie Biologique.

A Monsieur le Professeur

J. A. BARRE

Professeur de Clinique Neurologique à la Faculté

en reconnaissance de la sollicitude qu'il n'a cessé de me témoigner avant et pendant mon Internat.

A Monsieur le Professeur

Prosper MERKLEN

Doyen de la Faculté de Médecine

Professeur de Clinique Médicale

mon premier Maître d'Externat.

A Monsieur le Docteur

E. VAUCHER

Chargé de cours à la Faculté

qui m'a toujours porté un intérêt bienveillant et amical.

A mes Maîtres de la Faculté de Médecine de Strasbourg

AVANT-PROPOS.

Il nous tient à cœur de placer le nom du Professeur Léon Blum en tête de ce travail. C'est lui qui en a conçu l'idée, et au cours de recherches souvent ardues, il n'a cessé de nous apporter de précieux encouragements ; jusqu'à la veille de sa mort, il nous a guidé par son immense savoir et sa grande expérience. Ce travail est un faible témoignage de la gratitude que nous lui conserverons.

Monsieur le Professeur G. Schaeffer, après la disparition de notre maître, a bien voulu nous donner, pour la continuation de nos recherches, l'appui de sa haute compétence. Qu'il nous soit permis, de lui en exprimer ici notre reconnaissance.

Depuis que M. le Professeur Ambard a pris la Direction de la Clinique médicale B, il n'a cessé de diriger ce travail et de nous aider par des conseils éclairés. Nous le remercions de l'intérêt bienveillant qu'il nous a témoigné.

Nous remercions bien vivement Melle E. Lebreton, Chef des Travaux de Physiologie, qui nous a prêté à maintes reprises, un concours des plus aimables et des plus efficaces.

Nos remerciements vont également à P. Grabar, Docteur ès-Sciences, avec qui nous avons eu, pendant plusieurs années, la plus amicale collaboration dont il nous est agréable d'évoquer le souvenir.

Nous ne saurions terminer, sans dire la part qu'ont eue dans l'accomplissement de ce travail, nos amis C. Van Caulaert, Joseph Weill et H. Metzger.

INTRODUCTION.

Les recherches qui font l'objet de ce travail ont été commencées en 1927, au laboratoire de la Clinique Médicale B. Elles ont eu pour origine les constatations suivantes, faites à plusieurs reprises, dès 1923 :

l'injection à des lapins d'insuline insuffisamment purifiée, ne produisait pas les accidents convulsifs habituels, et la glycémie ne s'abaissait que très légèrement ;

l'injection à des lapins de produits résiduels de la fabrication de l'insuline (d'après un procédé voisin de celui de Collip) élevait la glycémie. Ces produits étaient injectés, dans le but de mettre en évidence des pertes éventuelles d'insuline.

En présence de tels faits, l'idée de l'existence dans le pancréas de deux substances à action opposée, l'une hyper, l'autre hypoglycémiante, se présentait tout naturellement à l'esprit.

La notion d'une substance antagoniste de l'insuline méritait d'être examinée de plus près. On sait, en effet, combien les problèmes de physiopathologie et de pathogénie du diabète restent encore obscurs. Le mécanisme d'action de l'insuline, l'action réciproque du pancréas endocrine et des autres glandes à sécrétion interne sont mal élucidés. L'insuline apparaît de plus en plus, comme un produit extrêmement complexe, dans la composition duquel entrent de nombreuses substances, à actions physiologiques variées.

Nous montrerons dans une première partie de ce travail, les constatations analogues aux nôtres signalées dans la littérature ; nous exposerons ensuite le détail de nos expériences personnelles. Nous essayerons enfin de tirer de cette étude des conclusions, tout en sachant que l'interprétation des actions physiologiques d'extraits d'organes exige la plus grande prudence, si l'on veut éviter la confusion, trop souvent faite, entre une action pharmacodynamique non spécifique et une action hormonique.

PREMIÈRE PARTIE.

APERCU HISTORIQUE.

Substances Hyperglycémiantes d'Origine Pancréatique.

Depuis la découverte, en 1889, du diabète pancréatique expérimental par von Mering et Minkowski, d'inlassables recherches ont été poursuivies dans tous les pays, dans le but d'isoler du pancréas le principe actif hypoglycémiant. L'existence de ce principe était admise par la plupart des auteurs ; ce n'est qu'en 1922 que Banting et Best ont réussi à l'isoler.

Pénau et Blanchard, dans une étude générale sur l'insuline considèrent, que deux causes surtout ont retardé l'isolement de l'hormone pancréatique :

la destruction in vitro de l'insuline par les ferments protéolytiques,

l'existence dans le pancréas d'une substance antagoniste de l'insuline.

Il y a longtemps déjà, que l'effet aggravant de certains extraits pancréatiques sur les symptômes du diabète expérimental avait été noté.

Sandmeyer, en 1894, faisant ingérer du pancréas crû à des chiens dépancréatés, signale une augmentation notable de la glycosurie ; cet effet disparaissait lors de l'ingestion de pancréas cuit. Les mêmes constatations ont été faites par Pflüger.

Pariset (1906), injectant du suc pancréatique dans la veine porte du chien, constate une augmentation du sucre dans les veines sus-hépatique et la ciculation périphérique.

Leschke (1910), opérant sur l'animal et l'homme diabètiques, obtient par l'injection d'extraits pancréatiques une augmentation de la glycosurie. Il est intéressant de noter la conclusion de l'auteur, qui met en doute l'existence d'une sécrétion hypoglycémiante du pancréas.

Depuis la découverte des procédés courants de fabrication de l'insuline, tous ceux qui se sont occupés de sa préparation et plus spécialement de sa purification, ont rencontré des fractions hyperglycémiantes ; ces fractions hyperglycémiantes sont considérées par la plupart des auteurs comme des souillures, dont il importe de se débarrasser.

En Amérique, J. B. Murlin et ses collaborateurs, ont particulièrement étudié les fractions hyperglycémiantes.

Murlin, Clough, Gibbs et Stokes, signalent en 1923, dans un travail sur des extraits aqueux du pancréas, la découverte récente d'un fraction dont l'action est opposée à celle de l'insuline, c'est-à-dire qu'elle produit une élévation de la glycémie chez des animaux normaux et diabétiques. Elle aurait, d'après ces auteurs une action dépressive sur le quotient respiratoire. Etudiant ultérieurement les précipitations de l'insuline à l'aide d'alcools supérieurs et d'acétone, Murlin et Kim-

ball obtiennent par précipitation d'un extrait aqueux acide de pancréas avec cinq volumes d'acétone, un précipité partiellement soluble dans l'alcool à 95°. Cette solution alcoolique est débarrassée de son alcool dans le vide et le résidu est repris par de l'eau. La solution aqueuse ainsi obtenue, donne par voie sous-cutanée des hyperglycémies marquées chez des chiens dépancréatés.

Exemple :

Chien N° 1. Glycémie initiale : 3.80 pour mille.
Glycémie, 3 h. après l'injection : 5.90 pour mille.

Chien N° 2. Glycémie initiale : 1.40 pour mille.
Glycémie 3 h. après l'injection : 3.90 pour mille.

C'est à ce produit hyperglycémiant que Murlin a donné le nom de «Glucagon». Il l'a appelé aussi «Glycagetic Substance», par opposition avec l'insuline : «Glycopyretic Substance». (*)

Des produits hyperglycémiants d'origine pancréatique ont été rencontrés également par Collip. Cet auteur a remarqué la production d'hyperglycémies précoces avec certaines insulines, l'hypoglycémie étant d'apparition tardive. Il explique ce phénomène par l'activation lente d'un proferment tissulaire, nécessaire à l'action de l'insuline. Choay fait remarquer que

*) Gibbs, Root et Murlin sont revenus sur cette question dans une communication au XIe Congrès intern. de Physiologie d'Edimbourg (1923). Quarterly Journ. of exper. Physiol. 1923).

l'action retardée de l'insuline observée par Collip, peut s'expliquer par l'existence de substances hyperglycémiantes, dont l'action serait plus précoce et plus fugace que celle de l'insuline.

Fisher, préparant de l'insuline selon le procédé de Doisy, modifie la précipitation finale, en ajoutant les neuf volumes d'alcool nécessaires en deux temps. Un premier volume d'alcool produit un précipité, qui est hyperglycémiant chez l'animal ; il cause la mort des rats et des cobayes en quelques minutes, après injections intrapéritonéales. Comme phénomènes toxiques, on note de la polypnée et des crampes violentes. A doses moins fortes, l'effet du produit est nettement hyperglycémiant (glycémies de 2.37 pour mille) sans être toxique. Par une narcose à l'éther l'auteur arrive à enrayer les phénomènes toxiques qui se manifestent surtout par une excitation des centres nerveux. Il dissocie ainsi l'action hyperglycémiante et l'action toxique.

Belfanti montre, que certains extraits éthéro-alcooliques du pancréas contiennent une substance qu'il appelle «Y» ; injectée à des lapins, elle détermine une hyperglycémie de + 50 pour cent. Pour cet auteur la substance «Y» et le «Glucagon» de Murlin sont identiques.

Petschacher obtient, en partant du pancréas de cheval, plusieurs fractions, dont il fait une étude chimique et physiologique ; avec l'une de ces fractions, administrée par voie endoveineuse, il obtient une baisse de la glycémie. La fraction voisine, produit par contre une baisse seulement minime de la glycémie. Elle contenait une substance ayant certains caractères de la leucine ; pour l'auteur la leucine serait hyperglycé-

miante, ainsi qu'il le montre d'ailleurs, par une injection intraveineuse au lapin de leucine Grübler, à raison de 0 gr. 20. Petschacher conclut que dans son extrait pancréatique, c'est un corps voisin de la leucine qui empêche l'hypoglycémie de se produire. Cette conclusion paraît pour le moins hasardeuse.

C. Funck, signale en 1927, qu'il a pu réaliser une division de l'insuline en deux substances cristallisées, qu'il appelle A et B. Alors que la substance A fait baisser l'hyperglycémie du diabétique, la substance B élève la glycémie du lapin de 400 pour cent et d'une façon durable, après injection et ingestion ; les doses employées sont des fractions de milligrammes.

Grevenstuck et Laqueur, consacrent, dans un travail de 1924 sur l'insuline, un chapitre, à ce qu'ils appellent l' «Anti-insuline». Quoiqu'ils réunissent sous cette appellation les diverses substances hyperglycémiantes rencontrées et signalées par les auteurs, ils ne reconnaissent pas à ces substances autant de spécificité, que le nom «Antiinsuline» pourrait le laisser supposer.

Meyer-Bisch, Bock et Wohlenberg, cherchent dans le pancréas l'origine des fractions hyperglycémiantes rencontrées au cours de la préparation de l'insuline ; par des injections intraveineuses d'ultrafiltrat de suc pancréatique, ils déterminent des hyperglycémies, ainsi que des phénomènes toxiques, aussi bien précoces que très tardifs. Ces auteurs pensent, que le principe hyperglycémiant n'est pas excrété dans sa totalité avec le suc pancréatique, mais est partiellement déversé dans le torrent circulatoire, où il jouerait un rôle physiologique antagoniste de l'insuline.

Foerster et Heuner ont pu retirer du pancréas une substance hydrosoluble à biuret négatif, produisant par voie endoveineuse une chute de la tension artérielle et une hyperglycémie.

Substances hyperglycémiantes provenant d'autres tissus que le pancréas.

Des substances hyperglycémiantes ont été rencontrées non seulement dans le pancréas, mais aussi dans d'autres tissus, aussi bien animaux que végétaux.

On sait qu'il en est de même pour l'insuline qui a été trouvée dans le foie par exemple ; mais Choay signale qu'on la sépare difficilement de substances hyperglycémiantes contenues dans cet organe.

Murlin a retrouvé le «Glucagon» dans le muscle de chat.

Dans un travail récent Bouisset, Rouzaud et Soula signalent des hyperglycémies chez le lapin après injections endoveineuses d'extraits spléniques, lipoïdiques et aqueux. Ces auteurs ne donnent aucune interprétation des phénomènes qu'ils observent.

Les tissus végétaux, surtout ceux riches en glycogène, ont pu fournir des substances hypoglycémiantes probablement identiques à l'insuline ; le type en est la «Glukokinin» de Collip, préparée avec de la levure. Or les premiers extraits de

levure de Collip produisaient fréquemment des hypoglycémies très tardives, faisant suite à des hyperglycémies initiales considérables (3 à 4 g. p. mille), mais passagères. A mesure que les purifications étaient poussées, l'effet hyperglycémiant initial s'estompait. Murlin a retrouvé le «Glucagon» également dans la levure ; c'est un principe analogue qui devait exister dans les premières insulines végétales de Collip.

Tous les faits que nous venons de rapporter sont notés isolément dans un certain nombre de travaux sur l'insuline. Jamais un travail d'ensemble n'a été consacré à l'étude de la nature chimique et au mécanisme d'action de ces produits hyperglycémiants. Ces produits hyperglycémiants ont été considérés surtout en tant qu'impuretés, susceptibles de réduire le rendement de la fabrication de l'insuline.

Hyperglycémie Initiale Post-insulinique.

La question des substances hyperglycémiantes d'origine pancréatique, a été placée sous un jour nouveau, par un grand nombre de travaux, faits surtout en Allemagne, sur le diabète dit «insulinique», et les hyperglycémies initiales, produites par des injections intraveineuses d'insuline.

L'hyperglycémie insulinique initiale a été signalée en 1926 par Guardabassi, et Muller et Petersen.

Burger et Kramer reprennent cette question et enfin Wichels et Lauber rapportent d'intéressantes recherches à son sujet. Ces derniers auteurs, injectant au lapin par voie veineuse de l'insuline, (2 à 5 unités) et répétant ces injections au moment de l'hyperglycémie initiale produite par l'injection précédente, arrivent à produire une hyperglycémie et une glycosurie persistantes. La glycémie peut s'élever à 4.50 pour mille et rester à ce niveau pendant des heures. Ce «diabète insulinique» est d'autant plus intense que la glycémie de départ est plus élevée. La plupart des insulines du commerce (Insulines Welcome, Brand, Leo, Novo, Schering et Lily) produisent cet effet. Voici une expérience de «diabète insulinique» d'après Wichels et Lauber :

Lapin de 2 Kg. 200, non à jeun.
Glycémie initiale : 2.09 pour mille.
Injection intraveineuse de 5 unités d'insuline Welcome, répétée ensuite toutes les dix minutes. Les glycémies sont déterminées d'après la méthode de Hagedorn-Jensen, dix minutes après la première injection et ensuite toutes les quarante minutes.

La courbe glycémique montre une ascension rapide ; elle atteint le chiffre de 4.60 pour mille après 80 minutes. Elle se maintient en plateau pendant 120 minutes. L'animal sacrifié après 250 minutes d'expérience, présente un foie vidé de glycogène. L'animal a fait de la glycosurie.

L'hyperglycémie post-insulinique initiale a été vérifiée par tous les auteurs qui l'ont recherchée. Son interprétation, toutefois est discutée, et l'accord est loin d'être unanime.

S'agit-il d'un effet de l'insuline elle-même ou d'une substance accompagnant l'insuline et agissant d'une façon précoce ; l'action se fait-elle directement sur le foie en libérant du glycogène, ou bien se fait-elle par l'intermédiaire d'un système endocrinien antagoniste de la fonction endocrinienne du pancréas (surrénale, thyroïde) ?

Wichels et Lauber pensent plutôt à une action indirecte de l'insuline elle-même sur le foie, par l'intermédiaire du système endocrinien déjà mentionné. Au contraire, Burger et Kramer admettent l'action directe sur le foie d'une substance accompagnant l'insuline ; pour ces auteurs cette substance serait préformée dans le pancréas. Ils rejettent par cette conception l'hypothèse d'un produit artificiel formé au cours des opérations d'extraction. Les faits suivants vont à l'appui de leurs conceptions :

l'injection d'insuline dans la veine porte a un effet hyperglycémiant marqué et le foie s'appauvrit en glycogène ;

l'hyperglycémie initiale insulinique est en général d'autant plus marquée que le foie est plus riche en glycogène ;

l'hyperglycémie initiale insulinique se produit encore après surrénalectomie et après énervation du foie ; la ligature des vaisseaux hépatiques la fait cesser.

Par les expériences suivantes, Bürger situe le rôle joué par l'insuline elle-même dans l'hyperglycémie insulinique :

de l'insuline Welcome chauffée pendant une demi-heure à 95° avec de la soude n/200 et neutralisée après cette opération, donne par injection intraveineuse une augmentation de la

glycémie de 19 pour cent chez l'homme. Cet effet s'obtient à raison d'une unité d'insuline par kilogramme ; l'insuline cristallisée d'Abel traitée de la même manière ne produit plus cet effet ; donc l'insuline elle-même ne peut être mise en cause dans la production du phénomène.

Enfin, le même auteur a constaté que l'hyperglycémie initiale insulinique ne se produit que très faiblement chez les hépatiques, d'où il pense tirer une application clinique, dans l'exploration fonctionnelle du foie.

L'hyperglycémie post-insulinique initiale très forte dans le myxoedème serait très faible dans la maladie de Basedow. Cette constatation, Bürger ne l'explique pas par une intervention intermédiaire de la thyroïde, mais par la richesse du foie en glycogène, plus grande dans le myxoedème, que dans le Basedow.

Les opinions de Büger ne sont pas entièrement partagées par Siegel, qui voit dans l'hyperglycémie initiale par l'insuline, soit un effet de choc, soit un effet toxique sur le foie, dû aux substances accompagnantes. Il cite à l'appui de son opinion, l'hyperglycémie du choc anaphylactique, décrite par La Barre.

Pour terminer nous ne ferons que citer les travaux de Loewi et de son école sur la «Glycémine», substance antagoniste de l'insuline, d'origine hépatique. (*)

Ces travaux n'ont pas résisté au contrôle de Loewi lui-même ; d'autres expérimentateurs, aussi bien en Allemagne qu'en France, (Hédon, Fontès et Thivolle) les ont infirmés.

---

*) La bibliographie de cette question est réunie dans un article de M. Wolf, P. médicale 1928 p. 3.

Tirer de tout ce qui vient d'être dit une conclusion ferme, est impossible à l'heure actuelle. Tout ce qu'on peut conclure, c'est que tous ces travaux posent d'une manière nette le problème d'un principe hyperglycémiant pancréatique existant à côté de l'insuline, produit hypoglycémiant, quelqu'en soit la provenance.

Tous ceux qui se sont occupés d'extractions d'organes, connaissent la difficulté de ce genre de recherches et la grosse part qui revient à l'empirisme. L'histoire de l'insuline illustre ce fait d'une façon éclatante.

Nous exposerons dans la seconde partie de ce travail nos propres constatations sur les principes hyperglycémiants, spécialement ceux d'origine pancréatique.

DEUXIÈME PARTIE.

EXPERIENCES PERSONNELLES.

Nos premières injections de produits résiduels de la fabrication de l'Insuline, produisaient des hyperglycémies d'une manière très inconstante. Ce n'est qu'après de nombreux essais préliminaires, dont le détail ne sera pas consigné ici, que nous sommes arrivés à établir une technique de préparation d'un extrait, dont l'activité était constante ; c'était un but essentiel à atteindre.

Nous étudierons tout d'abord les effets de notre extrait sur la glycémie, pour exposer ensuite nos tentatives de purification de cet extrait très impur. Les expériences rapportées, représentent presque exclusivement des mesures de l'activité hyperglycémiante.

Si les essais de purification ne nous ont pas conduits à l'isolement d'une substance hyperglycémiante très pure, ils nous ont du moins donné un certain nombre de résultats analytiques, permettant de préjuger la nature du principe hyperglycémiant et ses principales propriétés.

Après avoir essayé de préparer un produit hyperglycémiant à partir d'autres organes que le pancréas, nous avons étudié quelques conditions susceptibles d'influencer dans un sens positif ou négatif, l'activité hyperglycémiante de nos extraits.

Le mécanisme d'action du principe hyperglycémiant n'a pas été étudié expérimentalement dans ce travail.

CHAPITRE I.

Technique expérimentale.

Les produits, dont nous désirons étudier l'action ont été expérimentés exclusivement sur le lapin, et l'effet sur la glycémie noté deux heures et quatre heures après l'injection. Ces produits ont été administrés par voie sous-cutanée ; l'administration endoveineuse et entérale ont été étudiées séparément.

Les quantités de sang prélevées pour le dosage de la glycémie variaient entre O cc 5 et 1 cc de sang à chaque prise. Les dosages ont été effectués sur O cc 10 de sang total par glycémie, selon la méthode de Hagedorn-Jensen, qui a l'avantage de permettre avec une précision parfaite des dosages en grande série. Tous les dosages ont été faits en double.

Dans un certain nombre d'expériences les glycémies ont été déterminées quatre heures après l'injection seulement. C'est à ce moment, en effet, que les substances actives produisaient leur effet maximum, ainsi que des essais préliminaires nous l'avaient montré. Les glycémies initiales d'autre part, étaient toujours comprises entre 0,90 p. mille et 1,15 p. mille, chez des animaux à jeun depuis 12 heures. Seuls les produits à activité hyperglycémiante supérieure à 2,80 p. mille ont été considérés comme actifs.

Technique de préparation de l'extrait hyperglycémiant.

Nous avons employé comme matériel pancréatique du pancréas de veau, de bœuf et de cheval. Des produits actifs ont été obtenus à partir de ces trois variétés de pancréas. Toutefois le pancréas de veau nous a donné des résultats plus favorables ; étant moins graisseux et moins riche en tissu conjonctif que les pancréas de cheval et de bœuf, l'extraction est plus facile. C'est donc le pancréas de veau qui a été par excellence la matière première pour la préparation de notre extrait.

Les pancréas frais sont reçus dans de l'alcool à 95°, dans les proportions volumétriques suivantes : 1/3 de pancréas, 2/3 d'alcool à 95°. Le mélange est passé par une machine à hacher et la bouillie alcoolique de pancréas est agitée pendant trois heures dans une bouteille. Le mélange est filtré et le résidu de la filtration exprimé de tout le liquide y contenu. Le filtrat est réduit à 1/3 de son volume, par distillation dans le vide. On fait une nouvelle filtration de ce liquide concentré et l'on rejette le résidu. Le filtrat est encore réduit de volume et ce volume précipité dans un milieu alcoolique titrant 80°.

L'Insuline passe en solution ; le précipité est repris par de l'eau et sa solution aqueuse est reprécipitée en milieu alcoolique de 80°. On fait bien de répéter cette précipitation une troisième fois de manière à débarasser le précipité aussi complètement que possible de l'Insuline.

L'extraction à l'alcool à 80° fournit donc d'une part, une solution alcoolique d'Insuline et d'autre part un précipité

brunâtre gluant, collant au vase et très soluble dans l'eau. Ce précipité donne en solution aqueuse un liquide marron, visqueux qui est précisément l'extrait hyperglycémiant cherché. Nous appelerons cet extrait substance brute. (*)

Le principe du procédé d'extraction qui vient d'être décrit, n'est autre que celui de la fabrication de l'Insuline à l'acool neutre selon Collip, procédé basé sur l'inactivation de la trypsine par l'alcool et la solubilité de l'Insuline dans l'alcool à 80°.

Le temps le plus important de notre technique est la précipitation alcoolique à 80°. Nous reviendrons dans un instant sur ce point.

Cette technique nous a donné des résultats extrêmement constants et, remarque importante, chaque fois que nous nous en sommes écartés, l'activité hyperglycémiante n'était pas obtenue.

Description de la substance brute.

La substance brute, liquide visqueux de coloration brune foncée, présente un pH aux environs de 5,1.

Traitée par l'acide trichloracétique, elle donne un assez gros précipité protéinique. La chaleur donne un volumineux précipité de même nature, et d'aspect floconneux.

*) Dans le cours de l'exposé nous désignerons cette substance par S. B. = substance brute.

La réaction du biuret, ainsi que les principales réactions colorées des acides aminées sont positives. La réaction de Florence, caractéristique pour la choline, n'a jamais été trouvée positive.

L'extrait chloroformique donne, après évaporation, un résidu gras, peu abondant.

Les sels sont constitués surtout par des phosphates (précipité important de phosphomolybdate d'ammonium); les chlorures sont peu abondants, de même que les carbonates et les sulfates.

La dessication de la substance brute n'a pas réussie; nous aboutissions toujours à un produit gluant, fortement hygroscopique.

Action de la substance brute sur la glycémie.

Voici quelques exemples d'actions positives obtenues par la substance brute, préparée selon la technique décrite :

Tableau N° 1.

Lapin	Quantité injectée	Glycémie p. mille initiale	après 2 h	après 4 h	Remarques
46	5 cm³ de S. B.	0.80	1.35	3.10	Animal à jeun depuis 12 h Exitus dans la nuit
48	5 cm³ de S. B.	0.83	2.88	3.64	Animal à jeun depuis 12 h Exitus dans la nuit
36	5 cm³ de S. B.	0.84	2.78	3.10	Animal à jeun depuis 24 h Symptômes d'Intoxication deux heures après l'injection Exitus après 4 h
40	5 cm³ de S. B.	0.90		4.00	Animal à jeun depuis 12 h Exitus la nuit
42	5 cm³ de S. B.			3.00	Animal à jeun depuis 12 h Exitus la nuit

Chaque lot de S. B. a été essayé de la manière indiquée dans ce tableau.

Or, il arrivait parfois, qu'une S. B. malgré les mêmes quantités injectées, était absolument inefficace ou d'activité très réduite sur la glycémie ; ou bien encore il arrivait qu'une S. B. perdait son activité après quelques jours. Si une telle substance brute était reprécipitée en milieu alcoolique à 80°, l'activité hyperglycémiante apparaissait ou était renforcée.

Tableau N° 2.

Exemple d'une Réactivation.

Lapin	Quantité de S. B. injectée	Glycemie p. mille initiale	Glycemie p. mille après 4 h.	Remarques
30	5 cm³	1.10	1.19	Tous les animaux étaient à jeun Ils ont surcombé 24 h après la fin de l'expérience
28	5 cm³	1.05	1.90	
31	5 cm³	0.90	1.10	
Cette même S. B. est reprécipitée par de l'alcool à 80°, et le précipité est ramené par de l'eau au volume initial.				
47	5 cm³	1.05	2.28	Tous les animaux étaient à jeun. Ils ont tous succombé 24 h. après l'expérience.
49	5 cm³	1.05	3.02	
46	5 cm³	1.05	3.60	

Cette réactivation pouvait s'expliquer à première vue par un départ d'Insuline, à la suite de la dernière précipitation alcoolique. Il était facile de vérifier une telle supposition, en injectant à des lapins l'extrait alcoolique à 80°, provenant d'une S. B. inactive.

Tableau N° 3.

Injection d'une quantité importante d'extrait alcoolique à 80°, correspondant à 50 cm³ de S. B., par lapin.

Lapin	Glycémie p. mille initiale	Glycémie p. mille après 4 h.	Remarques
195	/	1.00	Les animaux n'ont pas fait d'accidents convulsifs et n'ont pas succombé.
93	/	1.11	
193	/	1.00	
194	/	0.90	

Ces expériences infirment nettement l'idée d'un départ d'Insuline.

Au sujet de la réactivation une remarque s'impose : La réactivation ne pourrait être qu'une impression, car les lapins ne réagissaient pas d'une manière uniforme à une même S. B. Ils présentaient parfois des différences individuelles, de sorte que des manques d'activité ont pu coïncider avec des états réfractaires.

Tableau N° 4.

Injection de mêmes quantités d'une même S. B. à 4 animaux.

Lapin	Quantité de S. B.	Glycémie p. mille initiale	Glycémie p. mille après 4 h.
194	5 cm³		1.20
195	5 cm³		3.25
36	5 cm³	1.10	1.22
40	5 cm³	0.84	3.10

Voici donc une cause d'erreur, dont il faut tenir compte ; toutefois, le fait de la réactivation a été observé avec une fréquence telle, que nous nous croyons autorisés à admettre sa réalité. Nous n'avons pas jusqu'à présent trouvé l'explication de ce phénomène de réactivation.

Durée de l'hyperglycémie provoquée par la substance brute.

Tableau N° 5.

Lapin	Quantité de S. B.	Glycémie p. mille initiale	après 2 h.	après 4 h.	après 8 h.	après 11 h.	Remarques
30	5 cm³	1.05	1.80	3.00	2.50	1.52	Pas d'accidents toxiques Pas de glycosurie Animal à jeun depuis 8 h.

L'examen de ces chiffres montre une action assez durable du produit hyperglycémiant ; l'hyperglycémie passe par un maximum, 4 heures après l'injection, et la glycémie reste encore relativement élevée 11 heures après.

Glycosurie.

La glycosurie a été recherchée systématiquement. Une seule fois nous l'avons trouvée très importante. Pour des glycémies de 3 et 4 p. mille, elle faisait presque toujours défaut ; des traces de sucre tout au plus, ont pu être trouvées dans les urines de certains animaux.

Le seuil rénal du lapin pour le glucose est en effet assez élevé, ainsi que les auteurs l'ont d'ailleurs signalé. (Bang)

Voici un exemple de glycosurie particulièrement intense :

Tableau N° 6.

Lapin 31, 1 Kg. 600, *à jeun depuis* 8 *heures, Injection de* 8 cm³ *de S. B. par voie sous-cutanée.*

Après	Glycémie p. mille	Urines	Remarques
4 heures	6,30	Sucre ++ Acétone 0	Léger tremblement de l'animal et hypersécrétion nasale
10 heures	2,05	Sucre ++ Acétone 0	L'animal ne présente pas de symptômes particuliers
18 heures	1,55	Sucre 0 Acétone 0	
36 heures			L'animal succombe; pas de lésion macroscopiques à l'autopsie

Ce cas est unique dans nos expériences, aussi bien par la valeur particulièrement élevée de la glycémie, que par l'importance de la glycosurie.

L'injection de notre produit a causé un véritable diabète, qui a duré environ 18 heures.

Conservation de la substance brute et persistance de son activité.

La S. B. conservée à la glacière, après adjonction de quelques gouttes de tricrésol, reste active pendant des semaines.

A plusieurs reprises cette activité avait néanmoins diminué ; dans ces cas il a suffi de faire une précipitation à l'alcool à 80° pour restituer à la S. B de fortes propriétés hyperglycémiantes.

Toxicité du produit.

On remarquera d'après les protocoles des expériences rapportées jusqu'à présent, que presque tous les animaux ont succombé plus ou moins rapidement après l'injection sous-cutanée de la S. B. Voici les signes d'intoxication observés : hypersécrétion nasale, apparaissant déjà une heure après l'injection ; tremblement généralisé, déclenché souvent par la mobilisation de l'animal. Grande faiblesse du train postérieur, dans un certain nombre de cas ; couchés sur le côté, les animaux n'arrivaient que difficilement à se remettre en position assise. Nous n'avons jamais noté de modification de la température rectale. Certains animaux enfin, ont présenté des crampes, rappelant absolument celles que l'on observe dans les états d'hypoglycémie.

D'autres signes d'intoxication n'ont pas été recherchés.

Chez certains animaux tous ces symptômes ont pu faire défaut, mais les animaux succombaient néanmoins, ou dans la nuit, ou dans les jours qui suivaient l'expérience.

L'idée qui vint tout naturellement à l'esprit fut d'attribuer l'effet hyperglycémiant à l'action toxique. Disons dès maintenant que les deux sont indépendants : nous avons observé en

effet fréquemment des exitus, ainsi que le cortège symptomatique décrit, sans la moindre hyperglycémie, et inversement, nous avons rencontré des hyperglycémies sans exitus, ni signes d'intoxication.

Tableau N° 7.

Lapin	Quantité de S. B. injectée	Glycémie p. mille initiale	Glycémie p. mille après 4 h.	Remarques
10	5 cm³	1.05	1.90	L'animal succombe 6 h. après l'injection, il a présenté dès la 3e heure des symptômes d'intoxication
11	5 cm³	1.10	1.15	L'animal succombe 8 h. après l'injection. Tableau d'intoxication complet

La question de la dissociation entre l'effet toxique et l'effet hyperglycémiant nous occupera ultérieurement. L'action toxique semble s'exercer sur les centres nerveux, à juger d'après l'excitation présentée par les animaux.

En dehors de cette action toxique générale le produit présentait une action nocive au point d'injection : la plupart des animaux faisaient à ce niveau des escharres et succombaient d'infection secondaire. Ceci n'a rien d'étonnant, étant donné que nous introduisions sous la peau une substance fortement hypertonique, donc nécrosante. L'injection sous-cutanée était le plus souvent douloureuse, comme en témoignaient les cris des animaux en expérience.

Doses injectées.

Lorsqu'on étudie des extraits d'organes il importe de connaître les quantités que l'on injecte. L'expression volumétrique employée jusqu'alors n'a pas de sens, sans indication de la densité du liquide. Nous aurions pu exprimer les doses employées en poids de pancréas frais ; nous avons préféré les exprimer en poids d'extrait sec, obtenu de la manière suivante : 1 cc de substance est évaporé au bain-marie et mis ensuite pendant 2 heures à l'étuve à 110°.

Voici réunis en un tableau les résultats d'un certain nombre d'expériences, destinées à montrer le rapport qui existe entre l'activité de la S. B., le poids d'extrait sec et le poids de l'animal.

Tableau N° 8.

Lapin	Poids	Q. de S. B. en cm³	Poids de l'Extrait sec correspondant	Glycémie p. mille après 4 h	Remarques
32	2 Kg 500	10 cm³	3 gr 88	3.47	Exitus 8 heures après l'injection
56	2 Kg	10 cm³	1 gr 44	1.80	Pas d'Exitus
53	1 Kg 900	8 cm³	4 gr 80	3.68	Exitus 24 h. après l'injection
57	2 Kg	15 cm³	4 gr 37	3.85	
31	1 Kg 600	8 cm³	4 gr 56	6.40	Exitus 36 h. après l'injection

Ces chiffres montrent la nécessité qu'il y a, d'injecter des doses suffisantes pour obtenir une hyperglycémie ; on constate que l'effet cesse d'exister pour des quantités d'extrait sec,

inférieures à 3 grammes. D'après ces chiffres le poids d'extrait sec indispensable pour obtenir un effet, serait de 2 grammes par kilogr. d'animal, donc une dose très importante.

Pour des raisons pratiques nous avons continué à exprimer volumétriquement les quantités injectées ; pour chaque lot de substance brute nous déterminions en cm^3 la dose hyperglycémiante minima, de manière à être à l'abri d'interprétations inexactes, dues à des injections de quantités insuffisantes.

CHAPITRE II.

ESSAIS DE PURIFICATION DE LA SUBSTANCE BRUTE.

La purification de la S. B. devait être dès lors notre principale préoccupation.

Il s'agissait de reconnaître dans quelle partie de ce complexe protéinique, gras et salin que constituait la S. B. siègeait l'activité hyperglycémiante. Celle-ci était-elle due à l'injection d'un complexe, ou était-elle le fait de la réaction acide de ce complexe, Säurediabetes d'Elias) ou bien encore existait-il dans la S. B. un corps bien défini doué de propriétés hyperglycémiantes?

La purification de la S. B. posait deux groupes de problèmes :

Trouver un précipitant ou un solvant spécifique du corps actif, ou bien débarrasser le complexe S. B., soit des albumines, soit des sels, soit des graisses, par des fractionnements successifs, et étudier autant que possible toutes les fractions obtenues au point de vue de leur activité hyperglycémiante. C'est ce deuxième objectif que nous avons surtout poursuivi.

Au cours de toutes ces expériences de purification, seules des S. B. à activité vérifiée ont été employées; ensuite nous avons toujours tenu compte de l'éventualité d'une perte de substance active au cours des purifications.

ESSAIS DE PURIFICATION AVEC DES ALCOOLS DE TITRE DIVERS.

L'alcool à 80° donnant un précipité contenant toujours la substance active, nous nous sommes demandés, si par l'emploi d'alcool variant entre 20° et 80° on n'arriverait pas pour un degré alcoolique donné à faire passer en solution un produit hyperglycémiant et à le séparer ainsi d'un précipité inactif.

Des extractions avec de l'alcool à 95° ont été tentées également.

Nous réunissons les résultats obtenus dans le tableau suivant :

Tableau N° 9.

Degré alcoolique	Liquide surnageant débarrassé de son alcool			Précipité alcoolique correspon repris par de l'eau		
	Lapin	Glycémie p. mille après 4h	Remarques	Lapin	Glycémie p. mille après 4h	Remar
Alcool à 60°, précipité abondant.	49	3.20	Animal malade, pas d'Exitus - Pas de Glycosurie			
	195	1.00	/			
	38	1.06	Pas d'Exitus	183	1.70	Pas d'E
	196	1.00		190	1.15	Exitus ap
	31	1.50	Pas d'Exitus			
	32	1.30	Pas d'Exitus	191	2.00	Exitus.
	42	1.06	Exitus la nuit			
	49	1.10	Exitus la nuit			
Alcool à 55° précipité moyen	194	1.05	Exitus la nuit			
	196	1.08	Exitus la nuit			
Alcool à 50° précipité moyen	38	1.06	Exitus la nuit			
	180	1.20	Exitus la nuit			
	26	1.10		42	1.08	Pas d'E
	46	1.60				
Alcool à 45° précipité peu abondant	48	1.05	Exitus la nuit	26	1.84	Exitus
	49	1.08	Exitus la nuit			
Alcool à 30 faible précipité	49	4.00	Exitus la nuit	180	1.07	Pas d'E
	195	1.80	Exitus la nuit	191	1.06	Pas d'E
	31	3.10				
	32	2.00				

Il ressort de l'examen de ce tableau que seul l'alcool à 30° extrait un liquide actif. Une seule fois l'alcool à 60° a

donné une extraction intéressante, d'autant plus qu'un important précipité d'impuretés était enlevé.

L'alcool à 30° au contraire n'enlevait qu'un faible précipité.

Il est intéressant de noter la disparition complète de l'activité par un traitement alcoolique, dans certaines de nos expériences.

Nous avons obtenu enfin des fractions extrêmement toxiques qui n'ont nullement élevé la glycémie. Cette constatation parle en faveur de ce qui a été dit plus haut : l'indépendance de l'action toxique et de l'action hyperglycémiante.

Le fait que certaines solutions alcooliques étaient très toxiques, devait faire penser à la possibilité d'extraire certaines substances toxiques par l'alcool.

Nous n'avons pas réussi à solubiliser une substance active dans de l'alcool à 95° ; on sait que Murlin avait observé la solubilité du «glucagon» dans l'alcool à 95°.

Des tentatives d'extraction avec des alcools acides n'ont pas donné de résultats encourageants.

ESSAIS DE PURIFICATION PAR LA CHALEUR.

Par ces essais nous avons poursuivi un double but : débarrasser la S. B. d'une certaine quantité d'albumine ; éprouver d'autre part la résistance à la chaleur du principe actif.

La substance brute a été chauffée au bain-marie (après dilution dans un certain nombre de cas), à des températures variant entre 45° et 80°. Le chauffage a été pratiqué également après des changements du ph. de la S. B. ; celle-ci a été soumise enfin à des ébullitions de quelques minutes.

Tableau N° 10.

Degré de Chaleur	Remarque sur la Manipulation	Produit injecté	Glycémie p. mille initiale	Glycémie p. mille après 4 h	Remarques
45° pendant 3 minutes	Faible précipité	Filtrat - 10 cm³ de S. B.		2.70	Survie
	Faible précipité	Filtrat - 10 cm³ de S. B.		1.70	Survie
55° pendant 3 minutes	Faible précipité	Filtrat - 10 cm³ de S. B.		1.35	Survie
	Faible précipité	Filtrat - 10 cm³ de S. B.		1.70	Survie
	Faible précipité	Filtrat - 10 cm³ de S. B.		1.28	Survie
	Faible précipité	Filtrat - 10 cm³ de S. B.		1.17	Survie
60° pendant 3 minutes	Précipité moyen	Filtrat - 12 cm³ de S. B.	1.10	2.55	Survie
	Précipité moyen	Filtrat - 12 cm³ de S. B.	0.80	3.06	Survie
	S. B. diluée 10 fois; précipité abondant	Filtrat - 12 cm³ de S. B.	0.88	1.23	Survie
	S. B. diluée 10 fois; précipité abondant	Filtrat - 12 cm³ de S. B.	1.02	1.06	Survie
	Subst. B. non diluée	Filtrat - 10 cm³ de S. B.	1.10	2.41	Survie
	S. B. non diluée	Filtrat - 10 cm³ de S. B.	0.88	2.22	Survie
	S. B. diluée 5 fois + 1 g 50 Nall par 10 cm³	Filtrat - 10 cm³ de S. B.	1.06	1.77	
	idem	Filtrat - 10 cm³ de S. B.	1.06	1.59	
70° pendant 3 minutes	S. B. diluée 10 fois	Filtrat - dose active de S. B.	1.04	1.13	Survie
	S. B. diluée 10 fois	Filtrat - dose active	1.04	1.41	Survie
80° pendant 3 minutes	S. B. non diluée	Filtrat à dose active	1.05	2.13	Survie
	S. B. non diluée	Filtrat à dose active	1.10	1.80	Survie
	S. B. non diluée	Filtrat	1.06	2.90	
	S. B. non diluée	Filtrat	1.06	2.50	L'animal succombe la nuit
	S. B. + 12 gouttes d'$H^2 50^4$ conc.	Précipité repris par $H^2 0$		1.24	L'animal succombe la nuit
	idem	idem		1.15	idem
	idem	Filtrat		1.05	
	idem	Filtrat		1.10	Survie
	Subst. brute non diluée	Totalité sans filtration	1.05	1.68	Survie
	idem	idem	1.00	2.13	Survie
Ebullition pendant 3 minutes (95°)	Précipité dense, caillebotté séparé par centrifugation	Liquide surnageant - 15 cm³ de S. B.		3.24	Survie
	idem	idem	1.10	3.35	Survie

Nous voyons donc que la S. B. est fréquemment inactivée par des chauffages même faibles. L'ébullition par contre permet de séparer de gros caillots et un liquide très actif. Nous pensons pouvoir expliquer de la manière suivante cette constatation paradoxale : suivant la température l'état physique du précipité variait ; il entraînait plus ou moins la substance active en l'enrobant, et de cette manière masquait son activité.

L'ébullition donnait un précipité dense bien différent des précipités obtenus par de plus faibles chaleurs ; nous pensons qu'il n'entraînait pas de substance active.

Quoiqu'il en soit nous pouvons dire que le principe actif est thermostable.

Le chauffage supprime la toxicité de notre produit, et c'est là un point important à retenir.

PRECIPITATION PAR L'ACIDE PICRIQUE.

Ces précipitations picriques ont été pratiquées de la manière suivante : Nous ajoutions à la S. B. un ou plusieurs volumes d'une solution saturée d'acide picrique. Le mélange était acidifié jusqu'à Congo positif, par de l'acide sulfurique concentré. Le précipité plus ou moins abondant était séparé sur Buchner, le filtrat et le précipité soumis enfin à une extraction éthérée prolongée au Soxhlet, jusqu'à départ complet de l'acide picrique. Les fractions terminales acides, étaient neutralisées par de la soude. Des essais préliminaires nous avaient montré, que l'éther n'extrayait pas de produit actif de la substance brute. Sur un grand nombre d'injections de fractions picriques, de rares résultats positifs ont été notés. Nous avons abandonné cette méthode.

Les quelques résultats positifs nous permettent de supposer que la substance active n'est pas précipitée par l'acide picrique.

CHANGEMENT DU pH.

En faisant varier le point isoélectrique des protéines contenues dans la substance brute, nous devions arriver à des précipitations protéiques. (Ce procédé a trouvé par ailleurs une application comme moyen de purification de l'Insuline).

Il était intéressant également de connaître l'influence de la réaction du milieu sur l'activité de la substance.

Milieux acides.

Expérience I.

20 cc de S. B. sont dilués par 10 cc d'eau. Cette dilution est acidifiée par de l'acide sulfurique à 25 pour cent, jusqu'à un pH. de 4,1. Il se forme un précipité de moyenne abondance que l'on sépare par centrifugation.

Une moitié du liquide centrifugé est neutralisée par de la soude et injectée à deux lapins.

Tableau N° 11.

Lapin	Glycémie p. mille 4 h. après l'injection	Remarques
191	3.65	Survie
194	1.20	Exitus la nuit

L'autre moitié du liquide centrifugé est injectée sans neutralisation préalable.

Tableau N° 12.

Lapin	Glycémie p. mille 4 h. après l'injection	Remarques
195	2.22	Survie
196	2.60	Survie

Expérience II.

20 cc de substance brute sont additionnés d'acide chlorhydrique conc. jusqu'à un pH. de 2,9.

Il se forme un précipité assez important.
Centrifugation.

Le liquide surnageant est neutralisé par de la soude jusqu'à un pH. de 5,5 et injecté à deux lapins.

Tableau N° 13.

Lapin	Glycémie p. mille 4 h. après l'injection	Remarques
31	2.20	Survie
45	3.05	Survie

Le précipité repris par de l'eau est injecté à un seul lapin.

Lapin	Glycémie p. mille 4 h. après l'injection	Remarque
180	1.00	Survie

Milieu neutre.

8 cc de S. B. sont amenés à la neutralité par de la soude ; il se forme un précipité minime.

Injection de la totalité du liquide au lapin 46.
Glycémie p. mille initiale : 1,03
Glycémie p. mille après 4 heures : 2,21
Remarque : Survie.

Milieu alcalin.

10 cc de S. B. sont amenés par de la soude à un pH. de 8,2.

Injection au lapin 71.
Glycémie p. mille initiale : 0,95
Glycémie p. mille après 4 heures : 3,85
Remarque :L'animal succombe 8 heures après l'injection.

Ces exemples nous font penser que le pH. n'influence pas l'activité de notre produit. Ce fait est important à connaître pour l'application éventuelle de techniques de purification, où le pH. du milieu subit des variations.

ULTRAFILTRATION.

Après toutes ces peu encourageantes tentatives de purification de la S. B., nous nous sommes adressés à l'ultrafiltration dont l'application nous a paru intéressante à plusieurs points de vue :

L'ultrafiltration est une méthode peu traumatisante, permettant d'évaluer le volume de la molécule active. Même si une séparation heureuse ne devait pas en résulter, la méthode de l'ultrafiltration pouvait nous donner des renseignements analytiques importants.

Nous avons employé l'ultrafiltre décrit par Grabar et Weill, en modifiant simplement la capacité du filtre et le volume de la bougie (capacité = 100 cc) ; l'ultrafiltration avec cet appareil se fait par pression à travers du collodion acétique durci. Les concentrations en collodion acétique employées ont été de 10 pour cent, 5 p. cent et 4,5 p. cent.

En dehors de la concentration en collodion il importe de tenir compte des variables suivantes : la durée du durcissement du collodion dans l'eau, la densité du liquide à filtrer et enfin le pH. de ce liquide.

Les filtrations ont été poussées chaque fois à fond, et complétées par des lavages répétés du résidu, avec de l'eau distillée.

Ultrafiltre au collodion à 10 p. cent.

Nous ne donnerons ci-après que les expériences les plus caractéristiques.

Expérience I.

10 cc de S. B. sont dilués par 100 cc d'eau.

Cette dilution est ultrafiltrée à travers un filtre durci pendant 4 jours dans l'eau ; on fait plusieurs lavages du résidu.

Le filtrat est concentré jusqu'à 10 cc et injecté. Il ne contient pas d'albumine.

Le résidu est injecté également ; il est très albumineux.

Tableau N° 14.

Lapin	Poids	Produit injecté	Glycémie p. mille 4 h. après l'injection	Remarques
71	1 kg 600	Filtrat	2.05	Survie
73	1 kg 400	Résidu	1.40	Survie

Expérience II.

10 cc de S. B. sont dilués par 100 cc d'eau et filtrés à travers un ultrafiltre, durci pendant 24 heures.

Seul le filtrat concentré a été essayé.

Lapin 73, 1 Kg. 400 :

Glycémie p. mille initiale : 1,05

Glycémie p. mille après 4 heures : 2,51

Remarque : Exitus après 12 heures.

Expérience III.

15 cc de S. B. sont dilués par 100 cc d'eau et passés sur un ultrafiltre, durci pendant 24 heures.

Injection du filtrat concentré, qui ne contient pas d'albumines et pas de graisses.

Injection du résidu de la filtration qui est très albumineux et ne contient pas de sels.

Tableau N° 15.

apin	Produit injecté	Glycémie p. mille		Remarques
		init ale	4 h. après l'injection	
42	Filtrat	0,88	2.41	Exitus
45	Filtrat	1.05	1.40	Exitus
46	Résidu	0.95	3.85	Survie
49	Résidu	1.10	1.66	Survie

Expérience IV.

20 cc de S. B. dilués à 100 cc d'eau sont passés sur un ultrafiltre durci pendant 24 heures.

Injection du filtrat ne contenant pas d'albumine.

Injection du résidu riche en albumine.

Tableau N° 16.

Lapin	Produit injecté	Glycémie p. mille initiale	Glycémie p. mille 4 h. après l'injection	Remarques
45	Filtrat	0,95	1.24	Exitus
46	Filtrat	1.03	1.23	Survie
48	Résidu		1.32	Survie
49	Résidu		1.70	Survie

Conclusions de ces expériences : L'ultrafiltration à travers du collodion à 10 p. cent ne semble pas se prêter à une application pratique, les résultats qu'elle donne étant trop inconstants.

Elle montre toutefois les faits suivants :

Aussi bien dans le résidu que dans le filtrat, l'activité hyperglycémiante peut disparaître complètement, ou du moins diminuer fortement.

Ce phénomène peut s'expliquer par une adsorption de substance active, dans les pores de l'ultrafiltre.

Nous voyons ensuite, que la substance active est ultrafiltrable dans certaines conditions, et que le résidu de l'ultrafiltration peut rester très actif dans d'autres circonstances. Nous n'avons pas élucidé ces conditions qui mériteraient une étude spéciale.

Ces dernières constatations nous font penser, que le produit actif n'est ni un protide, ni un lipide, ni un sel. En

effet : les expériences I et II, montrent des filtrats qui dépourvus d'albumine et de graisse sont encore actifs sur la glycémie ; l'expérience III montre un résidu ne contenant plus de sel et encore fortement actif.

— La partie toxique des produits hyperglycémiants semble être ultrafiltrable.

Ultrafiltre au collodion à 5 p. cent.

Expérience I.

15 cc de S. B. sont dilués par 100 cc d'eau et passés sur un ultrafiltre durci pendant 36 heures.

Essais avec le filtrat et le résidu.

Le filtrat donne un louche infime avec de l'acide trichloracétique.

Le résidu est fortement albumineux.

Tableau N° 17.

Lapin	Produit injecté	Glycémie p. mille 4 heures après l'injection	Remarques
38	Filtrat	2.70	Exitus
46	Filtrat	1.00	Exitus
48	Résidu	2.20	Exitus
49	Résidu	2.10	Survie

Expérience II.

15 cc de S. B. sont filtrés dans les mêmes conditions que dans l'expérience I.

Tableau N° 18.

Lapin	Produit injecté	Glycémie p. mille 4 heures après l'injection	Remarques
26	Filtrat	0,90	Exitus
32	Filtrat	0.85	Exitus
42	Résidu	1.00	Survie
191	Résidu	3.00	Survie

Par ces ultrafiltrations nous avons obtenu des filtrats ne contenant que des traces d'albumine. Dans cette première série nous constatons encore une grande variabilité en ce sens, que le principe hyperglycémiant traverse les ultrafiltres d'une façon capricieuse.

Nous nous sommes demandés, si des filtres durcis moins longtemps, ne donneraient pas des résultats plus satisfaisants.

Voici une série d'exemples où la durée du durcissement des filtres n'a pas dépassé 18 heures.

Expérience III.

12 cc de S. B. sont filtrés après dilution à 100 cc.

Le filtrat concentré contient des traces d'albumine.

Tableau N° 19.

Lapin	Produit injecté	Glycémie p. mille 4 heures après l'injecton	Remarques
60	Filtrat	3.00	Les animaux ont des crampes 2 h. après l'injection. Pas d'Exitus.
48	Filtrat	2.80	

Expérience IV.

Même quantité et même conditions que précédemment.

Tableau N° 20.

Lapin	Produit injecté	Glycémie p. mille 4 heures après l'injection	Remarques
59	Filtrat	2.40	Exitus
52	Filtrat	1.95	Exitus

Expérience III.

Mêmes quantités et mêmes conditions que précédemment.

Tableau N° 21.

Lapin	Produit injecté	Glycémie p. mille 4 heures après l'injection	Remarques
57	Filtrat	3.00	Tremblement 3 h. après l'injection Survie
75	Résidu	1.10	Survie

Les ultrafiltrats, dont nous venons d'étudier l'action, ne contenaient que des traces d'albumine.

La substance active traversait d'une façon satisfaisante des ultrafiltres à 5 p. cent, durcis seulement pendant 15 heures en moyenne. On notait une diminution constante de l'activité hyperglycémiante dans l'ultrafiltrat ; les ultrafiltrats restaient toxiques.

Ultrafiltre au collodion à 4,5 et 3 p. cent.

Les ultrafiltres à 4,5 p. cent nous ont toujours donné des purifications moins poussées que celles obtenues par les ultrafiltres à 5 p. cent ; ceux de 3 p. cent laissaient passer des quantités abondantes d'albumine, quel qu'ait été le temps de durcissement du collodion.

Au cours de certaines ultrafiltrations les eaux de lavage n'ont pas été réunies, mais étudiées séparément. Il nous a semblé que la substance active passait lors des deux premiers lavages ; le troisième ne donnait qu'une très faible hyperglycémie.

Les réactions des acides aminés ont été trouvées positives, déjà dans les premières portions d'ultrafiltrat.

ESSAIS DE PURIFICATION DE L'ULTRAFILTRAT (COLLODION A 5 p. CENT).

Sur ces ultrafiltrats dégraissés et pratiquement désalbuminés, nous avons tenté de nouvelles purifications.

Description de l'ultrafiltrat devant être soumis à une purification.

Il s'agissait d'un liquide brun dont le pH. était compris entre 5,1 et 5,6. Sa dessication donnait un produit gluant, fortement hygroscopique.

Réactions du biuret et des acides aminés positives.

Présence de phosphates, très peu de sulfates et de chlorures. Réaction de la Choline négative.

Emploi de la chaleur.

Nous avons essayé d'appliquer aux ultrafiltrats, ce que nous avaient appris les expériences de chauffage de la S. B.

En chauffant les ultrafiltrats de 5 p. cent à diverses températures, nous avons constaté une diminution, voire même une disparition de la toxicité. Nous obtenions encore des hyperglycémies, mais le rendement en produit actif devenait tellement mauvais, que nous avons abandonné cette voie.

Précipitations alcooliques à divers degrés.

Tableau N° 22.

Degré alcoolique	Liquide surnageant débarrassé de son alcool			Précipité alcoolique correspondant repris par de l'eau		
	Lapin	Glycémie p. mille 4 h. après l'injection	Remarques	Lapin	Glycémie p. mille 4 h. après l'injection	Remarq
Alcool à 80° précipité dense assez important	176	0,98		48	0,95	Survi
	196	1.00	Exitus	48	1.00	Survi
Alcool à 60° précipité moyen	51	1.20	Tremblement généralisé 12 1/2 après l'injection Pas d'Exitus	53	2.80	Survi
	52	2.15		56	2.80	Survi
	55	0,96		32	1.10	Survi
	54	0,99		33	1.05	Survi
Alcool à 45° Faible précipité	71	1.70	Survie			
	58	3.00	Exitus			

Conclusions : Les résulttas étaient positifs d'une façon très inconstante.

Nous retrouvions ici une fois de plus, une dissociation entre l'effet toxique et l'effet hyperglycémiant. Ces expériences nous montraient un fait déjà noté plus haut, à savoir que des produits toxiques pouvaient être extraits par de l'alcool.

Acide picrique.

Nous avons étudié, aussi bien le précipité, que la partie soluble, obtenue par cet acide dans les mêmes conditions que précédemment, dans le cas du produit brut.

Une seule hyperglycémie a été observée avec une fraction soluble. Nous retrouvions donc le fait déjà signalé, que l'acide picrique ne précipite pas la substance active.

Essais de purification par la baryte caustique.

Dans l'idée de débarrasser notre ultrafiltrat des sels (phosphates notamment) nous avons employé la baryte caustique, qui fournit un précipité abondant de phosphate de baryum. L'excès de réactif peut être enlevé quantitativement par l'acide sulfurique.

Voici un exemple que nous rapportons en détail :

30 cc de S. B. sont ultrafiltrés à fond sur collodion à 5 p. cent. L'ultrafiltrat, qui donne un louche infime d'albumine avec l'acide trichloracétique, est divisé en deux moitiés et chacune est soumise aux opérations suivantes :

On ajoute de la baryte en excès, on laisse stationner le mélange jusqu'à dépôt complet de l'important précipité ; l'excès de baryte du liquide surnageant est enlevé par une précipitation quantitative à l'acide sulfurique. Le sulfate de baryum, une fois déposé, le liquide surnageant est concentré dans le vide jusqu'à 20 cc. Ce liquide concentré est injecté à l'animal.

Mais, ce procédé a l'inconvénient, de nécessiter des manipulations avec de trop grands volumes de liquide, dont la concentration dans le vide est toujours une opération longue. Une application pratique n'était guère possible.

Les opérations qui viennent d'être décrites ont été répétées un certain nombre de fois. Malgré les manipulations nombreuses et malgré les variations considérables du pH., la substance active a pu être retrouvée à plusieurs reprises dans les liquides finaux ; elle n'était pas toxique.

DIALYSE DE LA SUBSTANCE BRUTE.

Nous avons essayé de nous rendre compte, si le passage de la substance active se faisait à travers une membrane par la seule dialyse.

Nous avons dialysé la substance brute à travers une membrane de cellophane, contre de l'eau distillée. A plusieurs reprises, et avec des dialyses d'une durée de 7 à 17 heures, nous avons obtenu une S. B. partiellement débarrassée de ses sels, encore active, mais toujours toxique.

Voici une telle expérience de dialyse :

15 cc de S. B. sont dialysés, comme il a été dit, pendant 9 heures. Le résidu de la dialyse est chauffé à 95° pendant 3 minutes, et le liquide est centrifugé.

Injection du liquide surnageant.

Lapin 45, 2 Kg. 500 :

Glycémie p. mille 4 heures après l'injection = 3,35

Urines : traces de sucre.

L'animal n'a pas succombé.

En conséquence nous avons admis, que la substance active ne pouvait pas dialyser.

La dialyse d'ultrafiltrats, donc de produits ne contenant pas d'albumine, ne nous a donné que des déboires ; la substance hyperglycémiante se perdait régulièrement, même dans le dialysat concentré.

Nous avons admis, que les albumines possèdent un certain pouvoir adsorbant vis-à-vis de la substance hyperglycémiante.

ESSAIS DIVERS DE PURIFICATION.

Extraction éthérée. — Celle-ci pratiquée dans un appareil de Soxhlet ne diminuait nullement l'activité de la S. B. ; donc l'éther n'extrayait pas le principe actif.

Extraction chloroformique. — Le produit gras extrait par le chloroforme, ne donnait pas d'hyperglycémie.

Alcool amylique. — Des extractions, à l'aide de cet alcool, ne nous ont pas donné satisfaction.

Acétone. — Par l'acétone ajouté progressivement à la S. B., nous avons obtenu une série de précipités d'aspect huileux ; ces précipités, n'ont jamais donné d'hyperglycémie.

En ajoutant des volumes croissants d'acétone à une substance brute préalablement amenée par de l'acide trichloracétique ou de l'acide chlorhydrique à un PH. de 2,9, nous

avons pu séparer toute une gamme de précipités blancs, granuleux ; mais l'activité hyperglycémiante n'a pu être retrouvée qu'atténuée, pour certains d'entre eux.

Nous avons remarqué, que l'acide trichloracétique ne précipite pas la substance active.

CHAPITRE III.

MODE D'ADMINISTRATION DE LA SUBSTANCE HYPERGLYCEMIANTE.

Dans toute ~~voie intraveineuse~~ les expériences rapportées jusqu'ici, seule la voie hypodermique a été employée, comme voie d'introduction de nos produits.

La voie endoveineuse devait donner a priori des réactions violentes, vue la composition de la S. B. ; nous ne l'avons jamais employée. L'administration d'ultrafiltrat désalbuminé par cette voie, pouvait au contraire être tentée.

Ces tentatives ont montré une toxicité extrême de l'ultrafiltrat, ainsi que l'illustrent les expériences suivantes :

Expérience I.

4 cc d'un ultrafiltrat (collodion à 5 p. cent) sont injectés lentement dans la veine marginale de l'oreille d'un lapin. Dès l'injection de 1 cc, 50 apparaissent des crampes violentes, du myosis, et l'animal succombe en moins de deux minutes ; nous venions de constater des accidents d'ordre nerveux extrêmement graves. Le sang retiré par ponction cardiaque au moment de la mort de l'animal présentait une glycémie de 1,40 p. mille

Expérience II.

Dans cette expérience nous avons injecté un ultrafiltrat (collodion à 5 p. cent) préalablement chauffé à 80°, pendant 3 minutes. La dose injectée a été de 1 cc seulement.

L'animal a fait des crampes passagères, comme seule réaction toxique.

Lapin 68 :

Glycémie p. mille	20 minutes après l'injection :	1,32
Glycémie p. mille	60 minutes après l'injection :	1,27
Glycémie p. mille	160 minutes après l'injection :	0,70

L'animal a succombé au cours de la nuit.

Expérience III.

Injection intraveineuse d'un mélange de 10 unités d'Insuline et de 1,5 cc d'ultrafiltrat.

Lapin 69 :

Glycémie p. mille	15 minutes après l'injection :	0,63
Glycémie p. mille	45 minutes après l'injection :	0,66
Glycémie p. mille	120 minutes après l'injection :	0,88

Dans cette expérience nous n'avons noté ni hyperglycémie initiale, ni hyperglycémie tardive. Nous n'avons pas non plus trouvé d'hypoglycémie ; l'animal n'a pas fait de crampes, il n'a pas succombé des suites de l'injection. L'insuline semble avoir protégé l'animal contre une dose toxique d'ultrafiltrat, et l'action de l'Insuline semble avoir été neutralisée par l'ultrafiltrat.

En raison de la toxicité trop grande des ultrafiltrats en application endoveineuse, nous avons définitivement rejeté ce mode d'administration.

Voie entérale.

Par cette voie nous n'avons obtenu que des résultats négatifs, malgré l'emploi de doses considérables.

CHAPITRE IV.

ESSAIS DE PREPARATION D'UNE SUBSTANCE HYPERGLYCEMIANTE A PARTIR D'AUTRES TISSUS QUE LE PANCREAS.

Nous avons signalé plus haut, qu'à l'aide de pancréas de bœuf et de pancréas de cheval, nous avons obtenu des produits actifs dans le sens que nous recherchions.

D'autres organes et tissus ont été traités ensuite, d'après la technique de préparation décrite plus haut.

Extraction de muscle frais.

Des doses massives d'extrait musculaire ont été injectées au lapin par voie sous-cutanée, avec les résultats suivants :

Tableau N° 23.

Lapin	Glycémie p. mille			Remarques
	Initiale	2 h après l'injection	4 h après l'injection	
94	0.84	1.06	1.06	Survie
39	0.97	0.95	1.19	Survie
30	0.95	1.05	1.05	La substance employée est la même que celle administrée à 49 et 39 mais reprécipitée en milieu alcoolique à 80°
47	0.97	1.00	1.03	
52			0.80	
65			1.05	

Extraction de foie de veau.

Cette extraction pratiquée toujours d'après la même technique, nous a fourni un produit liquide de pH. = 6,8 et très albumineux. Des doses massives ont été administrées avec les résultats suivants :

Tableau N° 24.

Lapin	Poids	Quantités injectées en cm^3	Quantités injectées en extrait sec	Glycémie p. mille Initiale	Glycémie p. mille 4 h après l'injection	Remarques
32	4 Kg	15 cm^3	1 gr 60	0.90	0.88	Survie
38	2 Kg 200	30 cm^3	gr 20	0.98	1.59	Exitus tardif.
48	2 Kg 100	30 cm^3	3 gr 20	0.99	1.70	Exitus tardif.

Extraction de corps thyroïde.

Le produit obtenu était très albumineux. Injecté à fortes doses il n'a pas produit d'élévation de la glycémie.

Lapin 66 :

Glycémie p. mille après 4 heures : 1,02

Injections sous-cutanées de substances diverses.

Ces injections ont été pratiquées, dans le but de montrer la stabilité de la glycémie du lapin vis-à-vis de substances variées. les unes riches en protéiques, les autres très acides, certaines enfin étant des corps bien définis de provenance pancréatique. Enfin des injections de peptone ont été essayées.

Extrait hypophysaire antérieur. — Ce produit, encore riche en albumine a été mis aimablement à notre disposition par Monsieur le professeur Aron.

Nous n'avons pas observé de modifications de la glycémie.

Extrait hypophysaire antérieur (Choay). — Aussi bien avec des extraits acqueux que des extraits liposolubles nous avons constaté une baisse minime de la glycémie.

Trypsine désséchée. — (Solution alcaline acqueuse) : Pas de changement de la glycémie.

Pancréatine : 2 grammes pour un lapin de 2 kilos. La glycémie n'a pas changé.

Chlorhydrate de Choline. — On injecte 0 gr. 04 de ce produit au lapin 58, poids 900 gr. : 4 heures après l'injection : glycémie p. mille : 0,88.

Nucléotide d'adénine. — On injecte 48 milligrammes de ce produit à un lapin de 2 kilos 100. Après 4 heures glycémie p. mille 1,34.

Nucléotide de guanine. — Injection de 48 milligrammes à un lapin de 2 kilos 250. Après 4 heures glycémie p. mille 1,15.

Solution de Peptone (Chapoteaux). — Injection de 4 gr.

Lapin 71, 1 Kg. 900 :
Glycémie p. mille initiale : 0,95
Glycémie p. mille 4 heures après l'injection : 1,04
Survie.

Solution de Peptone sèche. — Injection de mgr.

Lapin 67, 2 Kg. 900 :
Glycémie p. mille initiale : 0,95
Glycémie p. mille après 4 heures : 1,31
Survie de l'Animal.

Injection sous-cutanée d'un *mélange d'acide sulfurique* N/2 *et de chlorure de sodium à* 10 *p. cent aa* 5 cm^3.

Lapin 31, 2 Kg. 210 :
Glycémie p. mille initiale : 0,90
Glycémie p. mille après 4 heures : 0,88
Survie de l'Animal.

Il résulte de toutes ces expériences, que la substance hyperglycémiante ne peut être obtenue par notre procédé d'extraction, qu'à partir du pancréas.

Les injections sous-cutanées de substances variées n'ont pu provoquer des hyperglycémies.

De telles constatations suggèrent immédiatement l'idée d'une origine spécifiquement pancréatique du produit hyperglycémiant que nous étudions ; elles sont aussi en faveur d'un principe hyperglycémiant, bien défini.

Autolysats de Levure.

Sur le conseil de M. le Professeur Schaeffer et de Melle Lebreton, nous avons pratiqué des injections sous-cutanées d'autolysats de levure de bière. Ces autolysats se caractérisent chimiquement par leur grande richesse en bases en polypeptides et acides aminés les plus variés ; nous savons d'autre part que Murlin a pu extraire un produit hyperglycémiant également de la levure (celui qu'il a appelé «glucagon»), et que Collip, au cours de ses premiers essais d'extraction de la «glukokinin» ou insuline végétale à partir de la levure, était fortement gêné, par la présence d'une substance à activité hyperglycémiante précoce.

Voici réunis en un tableau les résultats d'une intéressante observation :

3 litres d'autolysat de levure de bière sont abandonnés à l'étuve à 37° ; de 24 heures en 24 heures on fait des prélèvements de 20 cm^3 d'autolysat qu'on injecte à des lapins, par voie sous-cutanée.

Tableau N° 25.

Date	Lapin	Poids	Durée de l'Autolyse	Quantité d'Autolysat (centrifuge)	Glycémie p. mille 4 heures après l'injection	Remarques
5 II 31	32	4 Kg 200	24 h	20 cm^3	0.92	Survie
6 II 31	180	1 Kg 600	48 h	20 cm^3	1.66	Survie
7 II 31	64	2 Kg	60 h	20 cm^3	3.21	Survie
8 II 31	31	2 Kg 400	84 h	20 cm^3	3.40	Survie
9 II 31	72	2 Kg	108 h	20 cm^3	1.71	Survie
10 II 31	34	3 Kg 200	132 h	20 cm^3	1.01	Survie

Il résulte de l'examen de ces chiffres qu'après une autolyse de 60 à 80 heures, apparaît dans l'autolysat une substance hyperglycémiante ; cette substance ne résiste pas à une autolyse dépassant 100 heures.

Quelques essais de fractionnement d'un autolysat actif, par des précipitations alcooliques et acétoniques, nous ont permis de retrouver une fraction hyperglycémiante. Ces expériences n'ont pas été poursuivies.

Nous pensons, que dans notre expérience l'autolyse a fait apparaître une substance absolument analogue à celle trouvée par Murlin et Collip, et en venons à cette idée, que toute substance hypoglycémiante insuline ou glukokinine est accompagnée d'une substance hyperglycémiante, et cela aussi bien dans les tissus animaux que dans les tissus végétaux.

CHAPITRE V.

ETUDE DE QUELQUES CONDITIONS SUSCEPTIBLES D'EMPECHER OU DE FAVORISER L'ACTION HYPERGLYCEMIANTE.

Les conditions que nous allons envisager sont d'une part l'état de jeûne, et d'autre part l'activité fonctionnelle plus ou moins grande de certaines glandes à sécretion interne. Nous pensons que les variations individuelles observées dans l'action hyperglycémiante de notre produit pourraient être mises sur le compte de ces conditions.

Du jeûne en effet, dépendra la richesse plus ou moins grande des tissus en glycogène ;

certaines sécrétions internes pourront présenter une action antagoniste vis-à-vis du principe hyperglycémiant, d'autres au contraire agiront de façon synergique et partant, renforceront l'activité hyperglycémiante.

Etat de jeûne.

Dans la majorité de nos expériences, nous avons utilisé des animaux à jeun depuis douze heures.

L'alimentation de nos lapins était saisonnière, c'est-à-dire, que les animaux n'ont jamais été soumis à un régime spécial, pendant les jours qui précédaient les expériences.

Maintes épreuves d'activité hyperglycémiante faites au cours de ce travail, nous ont montré d'une façon indubitable, que l'hyperglycémie était plus forte et plus constante, chez des animaux qui n'avaient pas jeûné.

Action simultanée de certains produits de sécretion interne et de la substance hyperglycémiante.

1° *Insuline.* — Cette question a été abordée dans le but de montrer un rôle éventuellement empêchant de l'Insuline elle-même sur la production de l'hyperglycémie. Voici deux expériences destinées à l'étude de ce problème.

Expérience I.

Une substance brute incomplètement débarrassée de son Insuline est injectée à deux lapins.

Tableau N° 26.

Lapin	Glycémie p. mille initiale	Glycémie p. mille 4 h après l'injection	Remarques
38	0.93	0.30	Accidents hypoglycémiques
191	1.10	0.68	Pas d'accidents hypoglycémiques

Cette même substance est précipitée en milieu alcoolique de 80°, et le précipité ramené par de l'eau au volume initial. Nous obtenons ainsi une nouvelle substance brute débarrassée d'Insuline, du moins partiellement.

Tableau N° 27.

Lapin	Glycémie p. mille initiale	Glycémie p. mille 4 h après l'injection	Remarques
31	0.93	1.82	Pas d'accidents
32	0.88	1.43	Pas d'accidents

Expérience II.

Injection simultanée de la substance hyperglycémiante, contenue dans un ultrafiltrat (collodion à 5 p. cent), et d'Insuline.

Tableau N° 28.

Lapin	Poids	Produits injectés	Glycémie p. mille 2 h	Glycémie p. mille 4 h après l'injection	Remarques
62	2 Kg	Ultrafiltrat seul		2.90	Exitus
61	2 Kg 100	Ultrafiltrat + 8 Unités d'Insuline mélangés	0.82	0.90	Survie
53	2 Kg 200	Ultrafiltrat + 8 Unités d'Insuline Injections séparées		3.85	Tremblements passagers.

Ces expériences font apparaître un antagonisme très net, entre la substance hyperglycémiante et l'Insuline.

2° *Produits à sécrétion interne, à action synergique avec la substance hyperglycémiante. Injection simultanée d'adrénaline et de substance hyperglycémiante.*

L'adrénaline a été injectée à la dose de 1/3 de mmgr. et *mélangée* avec une dose active de substance brute. L'animal utilisé pesait 2 kg. 100 et n'était pas à jeun ; malgré cette condition la glycémie n'est pas montée à un taux plus élevé que d'habitude.

Injection simultanée d'hypophysine postérieure, de thyroxine et de substance hyperglycémiante.

Là encore nous n'avons pas constaté d'augmentation de l'action hyperglycémiante de notre substance.

Une action synergique entre notre substance et certaines sécretions internes réputées antagonistes de l'Insuline et hyperglycéminates, n'est donc pas évidente.

TROISIÈME PARTIE.

CONCLUSIONS.

Nous nous proposons de réunir dans ce chapitre, les conclusions que nous avons pu tirer de chaque série d'expériences.

1° Il existe dans le pancréas à côté de l'insuline, principe hypoglycémiant, une substance, dont l'action est nettement hyperglycémiante chez le lapin, après injection sous-cutanée. Cette substance a été mise en évidence dans un extrait préparé selon une technique bien définie.

2° Cette même technique appliquée à d'autres tissus que le pancréas, ne nous a pas donné d'extraits hyperglycémiants.

3° Nous avons admis l'existence, dans nos extraits pancréatiques, d'un *principe hyperglycémiant*, dont certaines propriétés ressortent de nos recherches.

Ce principe est thermostable ; il est ultrafiltrable ; son activité n'est pas influencée par la réaction du milieu ; il n'est précipité ni par l'acide picrique, ni par l'acide trichloracétique.

4° Nous pensons que chimiquement ce principe n'est ni une protéïne, ni un ~~protide~~, ni un sel ; les tentatives d'isolement et de purification du principe hyperglycémiant n'ont pas abouti à un résultat positif.

5° Nos extraits hyperglycémiants contiennent des produits toxiques qui ne sont pas responsables des hyperglycémies provoquées ; en effet, l'ébullition supprime les effets toxiques, alors que l'action hyperglycémiante persiste.

6° Un principe hyperglycémiant probablement analogue à celui trouvé dans le pancréas, existe dans la levure de bière, où nous l'avons mis en évidence par l'autolyse.

7° Le principe hyperglycémiant du pancréas est antagoniste de l'insuline ; entre vraisemblablement dans la composition de certaines insulines du commerce.

On peut faire à noter travail des critiques diverses.

a) Nos expériences ont été pratiquées exclusivement sur le lapin, comme animal test. Or, on connaît la labilité de la glycémie du lapin, et la facilité avec laquelle il fait des hyperglycémies à la suite de toutes sortes de perturbations, telles que la saignée, les réactions émotives, la douleur, les effets de choc.

Nous pensons nous être mis à l'abri d'hyperglycémies accidentelles de cette origine. Les prises de sang ont toujours été faites avec le maximum de douceur et n'ont jamais dépassé 2 cc par prise.

Les injections ont été faites par voie sous-cutanée, si bien que des actions de choc n'étaient guère possibles ; les injec-

tions intraveineuses et intrapéritonéales, telles que les ont pratiquées certains auteurs, lors d'études des varations de la glycémie, auraient rendu l'interprétation bien plus difficile.

Enfin, il n'a été tenu compte que d'hyperglycémies supérieures à 2,80 pour mille ; ni la saignée, ni la douleur, pas plus que les états émotifs, ne sont capables d'élever la glycémie du lapin à des taux de cette importance.

b) Les doses d'extraits que nous avons dû employer pour obtenir des effets hyperglycémiants, étaient très massives. Voici une critique très importante, mais qui s'adresse avant tout à notre technique de préparation, dont le rendement est encore insuffisant.

CONCLUSIONS GENERALES.

La nature hormonique du principe hyperglycémiant étudié reste une hypothèse, dont la vérification demandera encore une expérimentation physiologique complémentaire et une étude du mécanisme d'action.

Nous nous sommes demandés si toute hormone hyperglycémiante, aussi bien d'origine animale que d'origine végétale, n'était pas accompagnée nécessairement d'une substance antagoniste, les deux étant étroitement unies pour agir dans des sens opposés sur le métabolisme des hydrates de carbone ; l'une serait combustive, l'autre frénatrice de cette combustion.

Si nous admettons la dualité de l'insuline, telle que la conçoivent MM. Ambard et Schmid (insuline à combustion et insuline à glycogène) nous devons attribuer au principe antagoniste deux propriétés ; d'une part, celle d'empêcher la combustion du glucose, d'autre part, celle de mobiliser le glycogène hépatique.

Nous aboutissons à la fin de ce travail à des hypothèses, qui pour nous, n'ont en attendant d'autre valeur, que celle d'indiquer le sens possible de recherches ultérieures.

Milieux acides.

Vu :
Le Doyen de la Faculté de Médecine :
Pr. MERKLEN.

Vu :
Le Président de Thèse.
L. AMBARD.

Vu et permis d'imprimer :
Strasbourg, le 17 Juin 1931
Pour le Recteur
Le Vice-Président du Conseil de l'Université :
J. DUQUESNE.

INDEX BIBLIOGRAPHIQUE.

Abréviations adoptées pour la nomenclature des Périodiques.

A. I. P. Th. — Archives internationales de Pharmacodynamie et de Thérapie.
A. J. P. — American Journal of Physiology.
A. A. P. — Archiv für Anatomie und Physiologie.
A. P. P. — Archiv für experimentelle Pathologie und Pharkologie.
B. s. Ch. B. — Bulletin de la Société de Chimie Biologique.
B. z. — Biochemische Zeitschrift.
C. K. M. — Centralblatt für klinische Medizin.
C. r. S. B. — Comptes-rendus de la Société de Biologie.
E. P. — Ergebnisse der Physiologie.
J. B. Ch. — Journal of Biological Chemistry.
K. W. — Klinische Wochenschrift.
M. K. — Medizinische Klinik.
M. m. W. — Münchener medizinische Wochenschrift.
P. A. — Pflüger's Archiv für die gesamte Physiologie.
P. M. — Presse Médicale.
Z. B. — Zeitschrift für Biologie.
Z. e. M. — Zeitschrift für die gesamte experimentelle Medizin.
Z. K. M. — Zeitschrift für klinische Medizin.

BANG I. — Der Blutzucker. Wiesbaden 1913.

BELFANTI S. — Intorno ad una sostanza iperglicemizzante negli estratti di pancreas. Rend. d. Ist. Lomb. Sc. lett. t. 57 p. 146 — 1924.

BOUISSET L., J. J. ROUZAUD et C. SOULA. — Action des extraits de rate sur la glycémie. A. i. P; Th. t. 38 p. 527 — 1930.

BUERGER M. — Hyperglykämisierendes Prinzip im Pankreas. Klinische Bedeutung K. W. p. 351 — 1931.

BUERGER M. und H. KRAMER. — Primäre Hyperklykämie und Glykogenverarmung der Leber, als Folge intraportaler Insulininjektion nach Untersuchungen am Hund. Z. e. M. t. 67, p. 441 — 1929.

BUERGER M. und H. KRAMER. — Ueber den hepatischen Angriffspunkt des Insulins. Die primäre paradoxe Insulinhyperglykämie. Z. e. M. t. 65, p. 487 — 1929.

BUERGER M. und H. KRAMER. — Die primäre initiale Insulinhyperglykämie nach Nebennierenextirpation. Z. e. M. t. 69, p. 57 — 1930.

BUERGER M. und H. KRAMER. — Klinische Bedeutung der initialen Insulinhyperglykämie. K. W. p. 104 — 1930.

CHOAY A. — La sécrétion interne du pancréas et l'insuline. Masson et Cie — 1926.

COLLIP J. B. — Delayed manifestation of the physiological effects of insulin, follwing the administration of certain pancreatic extracts. A. J. P. t. 63, p. 391 — 1923.

COLLIP J. B. — Glycokinin, new hormon in plant tissue. J. B. Ch. t. 56, p. 513 — 1923.

COLLIP J. B. — The original method as used for the isolation of insulin in semi-pure form for the treatment of the first clinical cases J. B. Ch. t. 55, p. XL (Proceedings) — 1923.

ELIAS H. — Ueber die Rolle der Säure im Kohlehydratsstoffwechsel. Säurediabetes. B. Z. t. 48, p. 120 — 1913.

FISHER N. F. — Preparation of Insulin. A. J. P. t. 67, p. 57 — 1923.

FOERSTER und HENNER. — Ueber einen neuen, den Blutdrucksenkenden Stoff. K. W. p. 1099 — 1924.

FONTES G. et L. THIVOLLE. — L'insuline n'augmente pas la fixation des glucides sanguines par les globules. Réfutation de la notion de Glycémie. C. r. S. B. t. 98, p. 847 — 1928.

FUNCK C. — Sur la séparation de l'insuline en deux substances actives. P. M. p. 70 — 1927 et Science t. 65, p. 39 — 1927.

GRABAR P. et WEILL J. — Contribution à l'étude de l'Ultrafiltration des liquides organiques. Technique et Appareillage. C. R. S. B. t. 104, p. 398 — 1930.

GREVENSTUCK A. und E. LAQUEUR. — Insulin. E. P. t. 23, II. p. I — 1924.

GUARDABANI M. — Hyperglykämie und Glykosurie nach Insulin. M. K. t. 26, p. 1342 — 1930.

HAGEDORN und JENSEN. — Zur Mikrobestimmung des Blutzuckers mittels Ferricyanid. B. Z. t. 135, p. 146 — 1923.

HEDON. — Existe-t-il dans le sang diabétique une substance à action hyperglycémiante? C. r. Soc. de Biologie t. 98, p. 564 — 1928.

KIMBALL C. P. and MURLIN J. R. — Aqueous extracts of pancreas. Some precipitation reactions of insulin. J. B. Ch. t. 58, p. 337 — 1923.

LA BARRE J. — Ueber die Ursachen der bei Meerschweinchen im akuten anaphylaktischen Schock auftretenden Hyperglykämie. A. P. P. t. 113, p. 368 — 1926.

LESCHKE E. — Ueber die Wirkung des Pankreasextraktes auf pankreasdiabetische und auf normale Tiere. A. A. P. p. 410 — 1910.

LOEWI O. — Glykämie und Insulin. K. W. p. 2169 — 1927.

LOEWI O. — Insulin und Glykämin. K. W. p. 391 — 1929.

MEYER-BISCH, BOCK und WOHLENBERG. — Antiinsulin und äussere Pankreassekretion. A. P. P. t. 136, p. 185 — 1928.

MERNIG J. (von) und O. MINKOWSKI. — Diabetes mellitus nach Pankreasextirpation. C. k. M. t. 23, p. 395 — 1889.

MUELLER E. F. und W. F. PETERSEN. — M. m. W. t. 18, p. 726 — 1926.

MURLIN J. R., CLOUGH H. A., GIBBS C. B. F. and STOKES A. M. — Aqueous extracts of pancreas. Influence on the carbohydrate metabolism of depancreatized animals. J. B. Ch. t. 56, P. 252 — 1923.

PARISET. — Hyperglycémie et glycosurie par injection de suc pancréatique dans le système veineux. C. r. S. B. t. 57, p. 64 — 1906.

PENAU et BLANCHARD. — Chimie de l'Insuline B. S. Ch. B. t. VIII, p. 383 — 1926.

PETSCHACHER L. — Ueber die Chemie des Pankreas. B. Z. t. 141, p. 109 — 1924.

PFLUEGER E. — Untersuchungen über den Pankreasdiabetes. P. A. t. 118, p. 267 — 1907.

SANDMEYER W. — Ueber die Folgen der Pankreasextirpation beim Hunde. Z. B. t. 31, p. 12 — 1894.

SIEGEL R. — Gibt es eine Insulinhyperglykämie ? M. K. Jahrg. 27 p. 428 — 1931.

WICHELS P. und H. LAUBER. — Der Insulindiabetes. Z. K. M. t. 114, p. 20 — 1930.

WICHELS P. und H. LAUBER. — Untersuchungen über den Entstehungsmechanismus des Insulindiabetes. Z. K. M. t. 114, p. 27 — 1930.

WOLF M. — La Glycémine. P. M. p. 3 = 1928.

TABLE DE MATIERES

Avant-Propos IX
Introduction 1
Première Partie. Aperçu Historique 3
Substances Hyperglycémiantes d'origine pancréatique 3
Substances hyperglycémiantes provenant d'autres tissus que le Pancréas 8
Hyperglycémie initiale Postinsulinique 9
Deuxième Partie. Expérimentation personnelle 14

Chapitre I. Technique expérimentale 16
Technique de préparation de l'extrait hyperglycémiant 17
Etude de la Substance Hyperglycémiante Brute 18

Chapitre II. Essais de Purification de la Substance Brute 28
Alcool 29
Chaleur 31
Acide picrique 33
Changement de pH. 34
Ultrafiltration 37
Dialyse 48
Essais divers 49

Chapitre III. Mode d'administration de la Substance Hyperglycémiante 51
Chapitre IV. Essai de Préparation de la Substance Hyperglycémiante à partir d'autres tissus que le pancréas 54
Injections de substances diverses 55
Chapitre V. Etude de quelques conditions susceptibles d'influencer l'activité hyperglycémiante 60

Troisième Partie. Conclusions 64
Index Bibliographique 69

Imprimerie
de la
Librairie Universitaire d'Alsace
Strasbourg
1931